

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 高村 摩衣

学 位 の 種 類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 ニューカッスル病ウイルス感染腫瘍ワクチンによる抗腫瘍応答の誘導

審 査 委 員

主査 教 授 萩原 克郎（獣医ウイルス学）

副査 教 授 廉澤 剛（獣医臨床腫瘍学）

副査 教 授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 准教授 岡本 実（獣医病理学）

学位論文要旨

ニューカッスル病ウイルス感染腫瘍ワクチンによる抗腫瘍応答の誘導

獣医学研究科 獣医学専攻 博士課程

高村 摩衣

腫瘍は 1981 年以來、日本において脳血管疾患を抜いて死亡原因の第一位となっている。ヒトと同様に伴侶動物においても、栄養の向上や予防医学及び治療医学の向上の結果、高齢化が進み、それに伴って腫瘍を原因とする死亡数が増加している。腫瘍の治療法は外科療法、化学療法、放射線療法の 3 つが主体であるが、現在、免疫療法が第 4 の治療法として注目されている。免疫療法の 1 つに自己腫瘍細胞を用いた腫瘍ワクチン療法が存在する。この腫瘍ワクチンは腫瘍関連抗原の特定を必要とせず、他の治療法と比べて重度の副作用が起きないことが利点であるが、腫瘍細胞は生体の免疫機構から逃れるためにその免疫原性が弱く、抗原提示における副刺激の欠如により T 細胞の応答を誘導するとの報告もある。従って、自己腫瘍細胞を用いた腫瘍ワクチンの応用には有効なアジュバントが必要と考えられており、現在、ニューカッスル病ウイルス(NDV)をアジュバントとして用いた腫瘍ワクチンについて研究が進められている。しかし、その抗腫瘍応答の誘導の機序については不明な点が多い。また、NDV は腫瘍細胞特異的に感染し、感染細胞からの Type I IFN の産生を促し、樹状細胞の成熟を促進するとともに、感染細胞の免疫原性を増強するとされているが、腫瘍細胞株間での NDV 感染性の違いが腫瘍ワクチンの効果に影響することが懸念される。

本研究では 4 章に渡り NDV による腫瘍ワクチンの免疫誘導性とその抗腫瘍応答誘導に重要なリンパ球サブセットについて検討し、さらに腫瘍細胞株間における NDV 感染性の違いとその改善について検討した。

第 I 章では、NDV の免疫誘導性について検討した。マウス線維肉腫細胞(WEHI164)、マウスメラノーマ細胞(B16)及びマウス扁平上皮癌細胞(SCCVII)を NDV B1 株感染後、UV で不活化した NDV 感染腫瘍ワクチン(NDV-TV)、または各腫瘍細胞を UV で不活化した腫瘍ワクチン(UV-TV)をマウスの腹腔内に接種し各腫瘍細胞に対して 2 種類の免疫マウスを得た。また、対照として培養液のみを接種した未免疫マウスを作成した。免疫後、各マウスから脾臓細胞を採取し、細胞傷害性 T 細胞(CTL)を誘導した後、各腫瘍細胞と共培養し、CTL による腫瘍細胞に対する細胞傷害性を検討した。WEHI164 及び B16 において対照及び UV-TV と比較して NDV-TV は有意に高い細胞傷害性を示した。また SCCVII においても、対照と比較して有意に高い細胞傷害性を示した。以上より NDV-TV は有効に抗腫瘍応答を誘導することが明らかとなった。

第 II 章では NDV-TV による抗腫瘍応答誘導において重要な各リンパ球の役割について検討した。NDV 感染 WEHI164 ワクチン(WEHI-NDV)によって作成した免疫マウスまたは培養液を接種し作成した未免疫マウスの脾臓由来リンパ球を磁気ビーズ法で各リンパ球サブセットに単離し、T 細胞・B 細胞を持たない C.B.17 *scid/scid* マ

ウス(scid)の腹腔内に様々な組み合わせで移入した。その後、WEHI164 を腹腔内接種し、4 週間観察した。免疫マウス由来(免疫)CD3⁺細胞(CD4⁺及び CD8⁺細胞および NKT 細胞)を移入した scid では生存率 80%であったが、未免疫マウス由来の CD3⁺細胞移入群では、腫瘍接種後 2 週間で死亡した。一方、免疫 CD4⁺及び CD8⁺細胞移入 scid では生存率 50%であり、生存個体において腹腔内の腫瘍増殖が認められた。しかし、NK、NKT 細胞を含む CD49b⁺細胞と免疫 T 細胞を移入した scid は 100%生存した。以上より免疫 T 細胞が WEHI-NDV による抗腫瘍応答誘導において中心的な役割を担い、免疫 T 細胞存在下で NK、NKT 細胞による抗腫瘍応答誘導が増強されることが明らかとなった。

第 III 章では腫瘍細胞株における NDV 感染性の違いが NDV-TV による抗腫瘍応答誘導に影響を与える可能性を踏まえ、各種腫瘍細胞株における NDV 感染性の違いについて検討した。マウス腫瘍細胞株である B16、WEHI164、SCCVII に加え、Lewis 肺腺癌(3LL)、膀胱癌(MBT-2)、乳腺癌(BALB-MC)を用いた。B16、WEHI164、3LL では高い NDV 感染率が見られ、SCCVII、MBT-2、BALB-MC で低い感染率を示した。各腫瘍細胞の感染前の IFN- β 遺伝子発現は有意差が認められなかったが、*Oasl2* および *Mx* 等の抗ウイルスエフェクター遺伝子発現は NDV 感染率と有意に負の相関を示した。また、各腫瘍細胞における IFN- β 反応性の違いについて検討した。その結果、IFN- β 処置後、*Oasl2* 遺伝子発現は NDV 感染率と有意に負の相関を示した。さらに JAK 阻害剤である Ruxolitinib (Rux)処理後に NDV を感染させると NDV 感染性が有意に改善し、感染前の抗ウイルスエフェクター遺伝子発現の低下が認められた。以上より、腫瘍細胞における NDV 感染性の違いは感染前の抗ウイルスエフェクター遺伝子の発現が影響していることが明らかとなった。

第 IV 章では Rux を用いて NDV 感染性を改善させ、作成した NDV-TV による抗腫瘍応答誘導について検討した。NDV 感染率の低い MBT-2 を用い、Rux 処理 NDV 感染 MBT-2 ワクチン(MBT-NDV-Rux)、NDV 感染 MBT-2 ワクチン(MBT-NDV)及び培養液を各々 C3H/HeN マウスに接種した。MBT-NDV-Rux 接種群において対照群及び MBT-NDV 接種群と比較して脾臓単核球における CD8⁺細胞数の上昇および IFN- γ 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。以上より、JAK 阻害処理によって NDV 感染性を改善することで NDV 感染腫瘍ワクチンによる Th1 型免疫応答誘導が増強することが示唆された。

本研究により NDV-TV-Rux によって多様な腫瘍に対し有効に抗腫瘍応答を誘導する事が示され、その抗腫瘍応答に重要な役割を担うリンパ球サブセットが明らかとなった。さらに本研究は、NDV による腫瘍崩壊作用を用いたウイルス免疫療法適応の臨床的判断基準においても有用な結果を示した。

審査委員会へのセールスポイント

- 新知見
 - NDV-TV が線維肉腫に対して効果的に抗腫瘍応答を誘導することが明らかとなった。
 - 腫瘍細胞株における NDV 感染性に影響する要因が感染前の腫瘍細胞における抗ウイルスエフェクターの遺伝子発現であることを明らかにした。
 - Janus kinase (JAK) inhibitor である Ruxolitinib 処理した後に、NDV を感染させることで腫瘍細胞における NDV 感染率を改善できることを明らかにした。
 - NDV 感染性を Ruxolitinib 処理で改善させた NDV-TV (NDV-TV-Rux)を用いることで、NDV 低感染性の腫瘍細胞株において CD8⁺T 細胞の増加と Th1 type の免疫応答を増強する可能性を示唆した。
- 独自性
 - Ruxolitinib を用いて NDV 感染性を改善させた NDV-TV(NDV-TV-Rux)に関しては現在、他での研究は報告されていない。
- 発展性
 - Ruxolitinib を用いることで NDV 低感染性の腫瘍細胞においても NDV-TV の適応が可能となる。
 - NDV は腫瘍崩壊性を有するため、NDV-TV のようなアジュバントとしての利用以外に腫瘍ウイルス療法にも用いられる。組織生検や手術で摘出した腫瘍細胞の抗ウイルスエフェクターの遺伝子発現を確認することで NDV 感染性が予測可能となるため、ウイルス療法の適応の指標となる可能性がある。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

研究の背景と目的

腫瘍は、日本では脳血管疾患を抜いて死亡原因の第一位となっている。ヒトと同様に伴侶動物においても、栄養の向上や予防医学及び治療医学の向上の結果、高齢化が進み、それに伴って腫瘍を原因とする死亡数が増加している。腫瘍の治療法は外科療法、化学療法、放射線療法の3つが主体であるが、現在、免疫療法が第4の治療法として注目されている。免疫療法の1つに自己腫瘍細胞を用いた腫瘍ワクチン療法が存在する。この腫瘍ワクチンは腫瘍関連抗原の特定を必要とせず、他の治療法と比べて重度の副作用がない利点があるが、腫瘍細胞は免疫原性が弱く、抗原提示における副刺激の欠如によりT細胞の応答を誘導する事があり、自己腫瘍細胞を用いた腫瘍ワクチンには有効なアジュバントが必要と考えられている。そこで本研究では、ニューカッスル病ウイルス(NDV)をアジュバントとして用いた腫瘍ワクチンについて着目した。仮説として、腫瘍細胞特異的に感染したNDVは、感染細胞からのType I IFNの産生を促し、樹状細胞の成熟を促進するとともに、感染細胞の免疫原性を増強すると考えられる。しかし、腫瘍細胞株間でのNDV感染性の違いが腫瘍ワクチンの効果に影響することが懸念される。従って本研究論文では、その背景要因と抗腫瘍機序を明らかにするためNDVによる腫瘍ワクチンの免疫誘導性とその抗腫瘍に重要なリンパ球について明らかにし、腫瘍細胞株間におけるNDV感染性の違いとその改善対策について検討し、今後の臨床応用展開への知見を4章に渡り解説している。

研究の成果

第I章では、NDVの免疫誘導性について検討した。マウス線維肉腫細胞(WEHI164)、マウスメラノーマ細胞(B16)及びマウス扁平上皮癌細胞(SCCVII)をNDV B1株感染後、UVで不活化したNDV感染腫瘍ワクチン(NDV-TV)、または各腫瘍細胞をUVで不活化した腫瘍ワクチン(UV-TV)をマウスの腹腔内に接種し各腫瘍細胞に対して2種類の免疫マウスを得た。免疫後、各マウスから脾臓細胞を採取し、細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導した後、各腫瘍細胞と共培養し、CTLによる腫瘍細胞に対する細胞傷害性を検討した。NDV-TVは、対照及びUV-TVと比較して有意に高い細胞傷害性を示し、有効に抗腫瘍応答を誘導することを明らかにした。

第II章ではNDV-TVによる抗腫瘍応答誘導において重要な各リンパ球の役割について検討した。NDV感染WEHI164ワクチン(WEHI-NDV)によって作成した免疫マウスまたは未免疫マウスの脾臓由来リンパ球を各リンパ球サブセットに単離し、T細胞・B細胞を持たないC.B.17scid/scidマウス(scid)の腹腔内に様々な組み合わせで移入した。その後、WEHI164を腹腔内接種し、4週間観察した。免疫マウス由来(免疫)CD3+細胞(CD4+及びCD8+細胞お

よび NKT 細胞)を移入した scid では生存率 80%であったが、未免疫マウス由来の CD3+細胞移入群では、腫瘍接種後 2 週間で死亡した。一方、免疫 CD4+及び CD8+細胞移入 scid では生存率 50%であり、生存個体において腹腔内の腫瘍増殖が認められた。しかし、NK、NKT 細胞を含む CD49b+細胞と免疫 T 細胞を移入した scid は 100%生存した。以上より免疫 T 細胞が WEHI-NDV による抗腫瘍応答誘導において中心的な役割を担い、免疫 T 細胞と NK、NKT 細胞を同時移入する事により抗腫瘍応答誘導が増強されることを明らかにした。

第 III 章では各種腫瘍細胞株における NDV 感染性の違いについて検討した。マウス腫瘍細胞株である B16、WEHI164、SCCVII に加え、ルイス肺腺癌(3LL)、膀胱癌(MBT-2)、乳腺癌(BALB-MC)を用いた。B16、WEHI164、3LL は高い NDV 感染率だが、SCCVII、MBT-2、BALB-MC では感染率が低かった。各腫瘍細胞の感染前の IFN- β 遺伝子発現は有意差がなかったが、*Oas12*および *Mx*等の抗ウイルスエフェクター遺伝子発現は NDV 感染率と有意に負の相関を示した。また、各腫瘍細胞における IFN- β 反応性は、*Oas12*遺伝子発現が NDV 感染率と有意に負の相関を示した。さらに JAK 阻害剤である Ruxolitinib (Rux)を腫瘍細胞に処理した後に NDV 感染させると感染前の抗ウイルスエフェクター遺伝子発現の低下と感染性が有意に上昇した。以上より、腫瘍細胞における NDV 感染性は、腫瘍の抗ウイルスエフェクター遺伝子の発現レベルが影響していることを明らかにした。

第 IV 章では Rux を用いて NDV 感染性を改善させた NDV-TV の抗腫瘍応答誘導について検討した。NDV 感染率の低い腫瘍細胞 MBT-2 を用い、Rux 処理した NDV 感染 MBT-2 ワクチン(MBT-Rux-NDV)、NDV 感染 MBT-2 ワクチン(MBT-NDV)及び培養液を各々 C3H/HeN マウスに接種した。MBT-Rux-NDV 接種群は、対照群及び MBT-NDV 接種群と比較して脾細胞中の CD8+細胞数の増加と IFN- γ 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。以上より、JAK 阻害処理によって NDV 感染性を改善することで NDV 感染腫瘍ワクチンによる Th1 型免疫応答誘導が増強することを明らかにした。

研究の評価

本研究により NDV を用いたウイルス免疫療法で重要となるウイルス感染性の問題点を整理し、その抗腫瘍応答に重要役割を担うリンパ球サブセットを明らかにした。また、多様な腫瘍に応用する対策として、Rux-NDV-TV によって有効に抗腫瘍応答を誘導する事を示した。この知見は、ウイルス免疫療法適応の臨床的判断基準においても有用な知見を示し、今後の治療法開発の一助になると考えられる。

以上のことから、高村 摩衣 氏は博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 4 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2018年2月7日

審査委員

主査	教 授	萩原	克郎
副査	教 授	廉澤	剛
副査	教 授	岩野	英知
副査	准教授	岡本	実